

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODJSEK

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

Regulatory T cells and their connection with tumors

SEMINARSKI RAD

Marin Volarić

Preddiplomski studij Molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	3
UVOD.....	4
REGULATORNE STANICE T.....	5
Porijeklo regulatornih T stanica.....	5
Funkcija regulatornih T stanica.....	7
ULOGA REGULATORNIH STANICA T U TUMORIMA.....	11
Veza regulatornih T stanica s tumorima.....	11
Uspostava populacija regulatornih T stanica u tumorskom tkivu.....	12
Aktivnost regulatornih stanica T u razvoju tumora.....	14
Komunikacija regulatornih stanica T s ostalim stanicama.....	14
ULOGA REGULATORNIH STANICA T U NASTANKU METASTAZA.....	19
ULOGA REGULATORNIH STANICA T U IMUNOTERAPIJI.....	21
ZAKLJUČAK.....	24
LITERATURA.....	25

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

SAŽETAK

Regulatorne stanice T su od početka ovog tisućljeća postale važna meta istraživanja. Regulatorne T stanice poput ostalih T limfocita svoj život počinju u timusu i igraju ključnu ulogu u imunosnom odgovoru. Za razliku od ostalih T limfocita koji imaju pretežito efektorno djelovanje, regulatorne T stanice u pravilu imaju supresivan učinak na ukupni imunosni odgovor. Takav imunosni učinak postižu na razne molekularne načine poput direktne supresije putem citokina, direktnom lizom ciljanih stanica ili u kombinaciji s drugim stanicama imunosnog sustava i izrazito su važni za uspostavu autoimunosti, oralne tolerancije, tolerigeničnosti, majčinske tolerancije itd. Mogućnost tako jake imunosne regulacije je od izrazite važnosti u kontekstu tumora, te brojna istraživanja potvrđuju vezu populacija Treg stanica s uspostavom, rastom i razvojem tumora te Treg stanicama kao važnom karikom i potencijalnom metom protutumorskih lijekova. U ovom radu ukratko će biti opisani osnovni mehanizmi diferencijacije Treg stanica i njihove normalne funkcije, veza između tumora i Treg stanica te njen značaj za razvoj tumora, kao i primjeri imunoterapija koji potkrepljuju tu vezu.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

UVOD

Među svim vrstama stanica u imunom sustavu viših kralježnjaka, uključujući i sisavce i ljude, jednu od najznačajnijih uloga u cijeloj priči igraju T-limfociti. Uz uobičajeno spominjane i često istraživane skupine T-limfocitapoput pomagačkih $CD4^+$ i ubilačkih $CD8^+$ limfocita postoji još nekoliko razreda regulatornih T limfocita, glavna odlika kojih je sazrijevanje u timusu, među kojima je jedan, do nedavno zanemarivani, a sada pokazano jedan od najvažnijih, razred koji bi mogao imati ključnu ulogu u potpunom razumjevanja mehanizma tumorskog preuzimanja kontrole imunim sustavom. Razred regulatornih (Treg) limfocita otkriven je 1970. kao razred T limfocita koji, za razliku od dosadašnjih otkrića o pojačavanju imunog odgovora, posjeduju mogućnost međureakcije s drugim stanicama u okolini na supresivni, odnosno utišavajući način¹. Ubrzo nakon njihova otkrića uslijedila su istraživanja koja su pronašla neke od karakterističnih biljega Treg limfocita. Biljezi koji su pronađeni za Treg stanice, u nekoliko godina nakon otkrića su IL2A i CD25², i zbog njihove neučinkovitosti u određivanju točnih Treg staničnih tipova i nepoklapanja s ostalim otkrićima sam pojam postojanja supresivnih T limfocita je pao u zaborav krajem 80-tih i početkom 90-tih³. Tek nakon otkrića, sada općeprihvaćenog biljega Treg limfocita, X-kromosom povezanog gena Foxp3⁴, dolazi do intenzivnijeg istraživanja točne funkcije Treg limfocita i njihove važnosti. Ubrzo nakon otkrića selektivnog biljega uslijedilo je mnoštvo istraživanja koja su povezali aktivnosti i funkcije Treg stanica s puno različitih autoimunih bolesti i poremećaja imunog sustava u miševa⁵, ali također s brojnim malignim oboljenjima u ljudi poput tumora dojki⁶, gastrointestinalnog sustava⁷, jetre⁸, te tumora jajnika⁹. Zbog dokazane važne uloge Treg stanica u brojnim oboljenjima u ljudi, važno je proučiti i objasniti mehanizme djelovanja Treg limfocita u normalnim fiziološkim stanjima kao i u patološkim uvjetima te načina modulacije s Treg limfocitima u borbi protiv tumora.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

REGULATORNE STANICE T

Porijeklo regulatornih stanica T

Širu skupinu regulatornih T limfocita koju objedinjuje isti cilj djelovanja regulacije imunosnog odgovora čine dva glavna podrazreda Treg limfocita: prirodni (nTreg) i inducirani (iTreg) limfociti. nTreg limfociti su obilježeni gore već spomenutim biljezima od trenutka krajnje diferencijacije u timusu (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), dok iTreg limfociti pripadaju skupini CD4⁺ Foxp3⁻ limfocita obavljajući njihovu konvencionalnu funkciju sve dok ne dođe do indukcije aktivacije Foxp3 gena u perifernom tkivu posredstvom TGF-1 β i IL-2.¹⁰

Obje skupine regulatornih T limfocita svoj život započinju u timusu. U timusu i nTreg i iTreg stanice moraju steći mogućnost razlikovanja tuđih i vlastitih antigena predloženih u sklopu MHC molekula procesom timusne klonalne selekcije. iTreg stanice zbog svoje takozvane „naivne“ prirode, odnosno sličnosti sa drugim razredima T limfocita, prolaze uobičajene dobro istražene procese selekcije u timusu kao i ostale s istim biljekom (CD4⁺) obilježene stanice¹¹. Proces diferencijacije nTreg stanica je drugačiji od onog ostalih CD4⁺ stanica u timusu. Istraživanja su pokazala da je za normalnu diferencijaciju nTreg stanica u timusu potrebna pravilna, precizno regulirana međureakcija različitih staničnih mehanizama.

Prvi od tih mehanizama je sličan onome koji je prisutan i u ostalim T limfocitima, put diferencijacije putem T staničnog receptora (engl. *T cell receptor*; TCR). Prilikom sazrijevanja nezrelih limfocita u timusu dolazi do selekcije staničnih puteva s obzirom na jačinu „signala“ odnosno jačinu vezanja TCR-a na endogene peptide predložene u sklopu MHC sustava. Istraživanja su pokazala da u nezrelih T limfocita vjerojatnost preživljavanja opada s rastom jačine TCR signala koji stanice dobivaju u svrhu smanjivanja autoreaktivnosti, odnosno u slučaju prejakoga vezanja native nezrele stanice ulaze u apoptozu. U slučaju nastanka odnosno određivanja puta diferencijacije nTreg limfocita važnu ulogu igra stohastički način odgovora stanica na jačinu TCR signala koje primaju, te je to ujedno i njihov prvi korak u diferencijaciji¹¹. Kao što je već spomenuto u slučaju prejakoga vezanja TCR-a najvjerojatniji ishod je apoptoza nezrelih limfocita, ali u slučaju srednje jakog vezanja dolazi do više mogućih ishoda diferencijacije stanice koji su neovisni i relativno slučajni događaji. Stanice mogu ući u apoptozu, preživjeti kao normalni CD4⁺ limfociti ili pak diferencirati se u nTreg stanice. Kako bi se dokazalo da upravo jačina vezanja TCR-a igra jednu od glavnih

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

uloga u primarnoj selekciji puta diferencijacije nTreg limfocita, a ne drugi glavni kandidat za taj posao, Foxp3 gen, bilo je ključno nekoliko istraživanja:

- istraživanja u kojemu je konstruiran knock-out Foxp3 gen s insrecijom GFP-a za istraživanje procesa selekcije limfocita ¹²
- istraživanje u kojem se ispitala veza jačine ekspresije Foxp3p gena i jačine vezanja visoko specifičnog TCR liganda u pogledu negativne selekcije ¹³

U oba slučaja pokazano je kako za preživljavanje limfocita koji pokazuju srednje jako vezanje za MHC predložene vlastite antigene nije bitan Foxp3 gen tj. da njegova ekspresija nastupa nizvodno na putu diferencijacije jer su i „knock-out“ i nedostatno izraženi Foxp3 subjekti bili imunodeficienti s tipičnim simptomima manjka Treg staničnih populacija, ali su im u timusu nađeni prekursori Treg stanica.

Drugi važan mehanizam diferencijacije nTreg stanica u timusu je onaj posredovan citokinima, ključni citokin IL-2 i u manjoj mjeri IL-7 i IL-15. Mehanizam djelovanja tih citokina na regulatorne stanice (kako u timusu i u perifernom tkivu) koristi IL-2RG receptor za prijenos signala te poticanja daljnje diferencijacije, na način čiji se točni stanični putevi još nisu u potpunosti razriješili. Glavnu ulogu u staničnoj signalizaciji po svim istraživanjima za sada igra IL-2, te uklanjanje mogućnosti proizvodnje tog citokina smanjuje populaciju Foxp3 limfocita i do 50%. Kao dodatna potvrda važnosti citokina u signalizaciji diferencijaciji, kombinatno uklanjanje proizvodnje svih citokina povezanih s putem aktivacije regulatornog puta, te neovisne mutacije IL-2RG u potpunosti uništavaju populaciju regulatornih limfocita u krvi.^{14,15,16} Glavni kandidat za poticanje daljnje diferencijacije nTreg stanice u timusu je za sada STAT5 protein, koji je pokazan da veže Foxp3 promotor tako pokrećući njegovu transkripciju, te je pokazano da selektivna delecija STAT5 proteina drastično smanjuje populacije normalnih Treg limfocita u krvi.¹⁷

Nedavna istraživanja su, uz ove sve gore navedene najvažnije mehanizme diferencijacije i selekcije Treg stanica, ukazala na važnost miRNA u selekciji i diferencijaciji nTreg stanica u timusu. miRNA su kratki slijedovi prepisane genomske RNA duge do 25pb koje igraju važnu ulogu u regulaciji ekspresije različitih gena. Mehanizam utišavanja već transkribirane molekule RNA je pod kontrolom Drosha i DICER proteina kojima miRNA služi kao „navigacija“ do ciljane molekule mRNA na koju miRNA navodi da bi ju utišala. U mišjim modelima jedinice utišanih DICER i Drosha proteina za posljedičnim gubljenjem mogućnosti posttranskripcijske modifikacije putem miRNA dolazi do pojave fenotipski istih osobina

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

poput onih s Foxp3 „knock-out“ genom, ali i mutiranje istih proteina u stanicama kojima se imuni sustav koristiti za indukciju regulatornih stanica putem citokina iTreg stanica rezultira istom nedostatnom diferencijacijom stanica u periferiji, što predstavlja potencijalni terapijski značaj za miRNA bazirane protutumorske lijekove.

Iako je najvažnija odlika Treg staničnih tipova ekspresija Foxp3 gena i njihova regulacija imunskog odgovora na ciljnim mjestima, postoji pitanje jesu li inducirane T regulatorne stanice i native regulatorne stanice dva ista tipa stanica s istim funkcijama ili svaki tip ima svoj određeni skup funkcija koje zajedno čine bitan način regulacije imunskog odgovora. Razlike u temeljnim mehanizmima ekspresije gena poput CNS1 elementa, različiti repertoar TCR-ova^{18,13}, kao i različit način indukcije u periferiji, gdje je indukcija iTreg stanica u periferiji posredovana u velikoj mjeri citokinom TGF- β ¹⁹, koji nije doveden u vezu s indukcijom nTreg stanica; također mogućnost indukcije iTreg populacija putem reakcije sa nekim alergenima¹⁹ ili stranim peptidima, nasuprot indukcije putem auto-antigena nativnih regulatornih stanica upućuju na to da su i sami izvršni mehanizmi iTreg stanica i nTreg stanica različiti. Huang i suradnici su tako uspješno dokazali različiti utjecaj iTreg i nTreg stanica na tolerogenost u astmatičnih miševa, gdje su se iTreg stanice pokazale kao uspješniji tolerigeni²⁰. Upravo ta relativna razlika u jačini tolerigeničnosti može reći nešto o samoj prirodi tih dvaju skupina regulatornih stanica, odnosno da se sami načini uspostave funkcije i načini putem kojih tvore uspješni imunosupresivni odgovor razlikuju te da je spektar njihovog djelovanja veoma širok.

Funkcije regulatornih stanica T

Normalni fiziološki život Treg stanica je netom nakon otkrića bio definiran kao primarno podređen regulaciji autoimunosti odnosu dokidanju iste. Do sada je daljnim istraživanjima potvrđeno 10 funkcija Treg stanica u imunskom sustavu, a sigurno postoji još mnoštvo neotkrivenih. Tih spomenutih 10 do sada prepoznatih funkcija Treg stanica su:

1. prevenciji autoimunih bolesti²¹
2. supresiji alergija i astme²²
3. indukciji oralne tolerencije²³
4. indukcije majčinske tolerancije na fetus²⁴
5. supresija patogen-asocirane imunopatologije²⁵
6. supresija odgovora slabo aktiviranih T stanica²⁶

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

7. kontrola jačine odgovora uzrokovana aktivacijom T stanica²⁷
8. zaštiti simbiotskih bakterija od prepoznavanja i uništavanja od strane imunosnog sustava²⁸
9. regulacija cijelog izvršnog imunosnog odgovora
10. spriječavanje priekomjerne reakcije aktiviranih T stanica u slučaju kada su aktivirane jakim vezanjem i šire svoj napadački ustroj prema onim stanicama koje imaju čak i slične MHC molekule, bez potrebnog prepoznavanja²⁹

Ovakav navedeni šitoki spektar funkcija daje Treg stanicama veliku i nezamjenljivu ulogu u kontekstu raznih procesa koji su glavni čimbenici imunosnog odgovora, a ono što im omogućuje regulativnu ulogu u mnoštvu procesa su upravo molekularni alati koje koriste za regulaciju imunosnog odgovora odnosno za komunikaciju s ostalim stanicama. Budući da su u zadnjem desetljeću meta mnogih istraživanja postale upravo regulatorne stanice T kao i važnost njihovog utjecaja na već gore pokazanim razinama velika je pažnja posvećena razotkrivanju mehanizama koje te stanice koriste da bi obavljale svoju zadaću.

Supresija imunosnog odgovora putem citokina

Najdulje poznati, najbolje istražen te najvažniji mehanizam supresije imunosnog odgovora jest mehanizam u kojem Tregstanice koriste protuuplane citokine za obavljanje svojeg zadatka. Najvažniji protuupalni inhibitorni citokini koji koriste regulatorne stanice su IL-10 i TGF- β , a u zadnje vrijeme ukazano je i na važnost do tada zanemarivanog citokina IL-35 u cijeloj priči³⁰.

Iako najviše istraživani i najdulje poznati mehanizam supresije Treg stanica, podaci koje su istraživanja pokazala nisu baš jednoglasni. Naprimjer stanični modeli u kojima je spriječena proizvodnja i vezanje IL-10 i TGF- β su pokazali da ta dva citokina nisu nužno esencijalni za pravilnu funkciju Treg stanica dok se *in vivo* istraživanja ne slažu sa tim rezultatima, tako je, naprimjer, u mišjim modelima astme i alergije pokazano da razvoj poremećaja posredovan aktivnostima nTreg i iTreg stanica u viskoj razini povezan sa IL-10, ali i s TGF- β ³¹, dok je nasuprot tome drugo istraživanje pokazalo da se isti fiziološki odgovor može ostvariti putem transplantacije IL-10⁺ Treg stanica u inače Treg deficijentne miševe³², što može dovesti do zaključka da su ti citokini, iako u maloj mjeri lučeni od strane Treg stanica, u nedovoljnoj količini da igraju značajnu ulogu već da je porijeklo imunosno djelotvorne količine od nekih drugih stanica u okolini aktivnih Treg stanica. Glavni kandidati za te količine djelotvornih

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

citokina su supresorske efektorne stanice T, te se pretpostavlja da su one onda glavni izvor IL-10 i TGF- β sa svrhom dodatnog utišavanja imunosnog odgovora. Da je to tako pokazali su infektivni modeli miševa poput onih injiciranih s *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major* i *Trichinella spiralis*^{33,34,35} u kojima je IL-10 imao veliku važnost na imunosni odgovor, ali da taj IL-10 nije porijeklom iz Treg stanica.

Kako bi se dodatno zakomplicirala priča regulacije supresije pomoću protuupalnih citokina, istraživanje utjecaja IL-10 proizvedenog od Treg stanica na upalni poremećaj crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*; IBD) pokazalo je upravo suprotno od prijašnjih istraživanja, gdje je upravo IL-10 izlučen od strane Treg stanica igrao veliku ulogu u regulaciji imunosnog odgovora³⁶. Uz to dodatna istraživanja koja su pokazala važnost Treg proizvedenog IL-10 u regulaciji indukcije majčinske tolerancije na fetus³⁷ ukazuju na jednu jako široku sliku djelovanja citokina gdje imunosni sustav u različitim situacijama na različite načine koristi proizvodnju protuupalnih citokina za posredovanje imunosnim odgovorom.

Supresija imunosnog odgovora direktnom lizom stanica

Za razliku od regulacije supresije citokinima, u ovom slučaju situacije nije toliko zamršena. U ljudi je pokazano da sve CD4⁺ stanice, pa tako i Treg stanice, posjeduju određenu količinu citolitičnog granzima A, te da Treg stanice pomoću perforina, granzima A i adhezije posredovane CD18 proteinom uzrokuju lizu ciljanih stanica³⁸. Također je pokazana važnost granzima B za izravnu citolitičku sposobnost Treg stanica u mišjim modelima. Granzim B je na primjeru mišjih modela pojačano izražen u Treg stanicama, te je pokazano da Treg stanice deficijentne u granzimu B imaju drastično smanjenu citotoksičnu aktivnost³⁹.

Supresija imunosnog odgovora putem međureakcije s dendritičkim stanicama

Uz mehanizme koji direktno djeluju na efektorne stanice T na mjestima imunosnog odgovora, pokazano je da Treg stanice međureagiraju s lokalnim dendritičkim stanicama pružajući dodatnu razinu kontrole imunosnog odgovora. Iako je tema te međureakcije izrazito zanimljiva, istraživanja koja potvrđuju i produbljuju sadašnja saznanja nisu mnogobrojna. Pokazano je nekoliko bitnih stvari za utvrđivanje veze između dendritičkih stanica i Treg limfocita. Prvenstveno pokazano je postojanje direktnog dodira dendritičkih stanica i Treg stanica, također smanjivanje ekspresije CD80 i CD86 u *invitro* uvjetima u dendritičkim stanicama kao posljedica djelovanja Treg stanica⁴⁰ te utjecaj Treg na dendritične stanice putem

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

CTLA4 receptora u slučaju probavnih upala⁴¹. Posljedica međureakcija CTLA4-CD80/CD86 receptora je IDO (indolamin 2-3 deoksigenozom) posredovano djelovanje dendritičkih stanica na efektorne T stanice te nastajanje povratne petlje indukcije dentritičkih i Treg stanica (petlja koja će biti kasnije objašnjena u radu).

ULOGA REGULATORNIH STANICA T U TUMORIMA

Veza regulatornih stanica T s tumorima

Tumorske stanice prilikom svojeg nastajanja i prikupljanja različitih mutacija koje im omogućuju kancerogeničnost moraju moći proći razne kontrolne točke koje je imunski sustav domaćina pripremio u svrhu obrane, te se također tijekom cijelog svog života tumorske stanice u organizmu aktivno bore protiv imunskog sustava domaćina na veoma interesantne načine. Tumorske stanice će izložene pritisku od strane imunskog sustava, poput svakog normalnog sustava kojem je u interesu proliferirati, pokušati naći učinkovit način obrane od sustava koji je stvoren da ih pronade i ubije. Vrijednog saveznika tumorske stanice u toj iscrpnoj bitci nalaze upravo u regulatornim stanicama T. Kao što je već spomenuto regulatorne stanice T posjeduju mnoge mehanizme supresije imunskog odgovora i indukcije ostalih stanica u svojoj okolini na promjenu djelovanja i upravo tu sposobnost tumorske stanice iskorištavaju za svoju obranu.

Važnu ulogu u novačenju, održavanju, proliferiranju, aktiviranju te djelovanju regulatornih stanica T ne igraju direktno stanice tumora već tumorski mikrookoliš koji one stvaraju u svojoj blizini. Tumorski mikrookoliš (engl. *Tumor Micro Environment*; TME) je u zadnjih desetak godina postao vruća tema istraživanja potencijalnih protutumorskih terapija jer je on ključan za održavanje populacija tumorskih stanica usprkos trudu imunskog sustava da ih uništi. Istraživanja su pokazala da glavni igrači imunskog sustava tj. citotoksične CD8⁺ i pomoćne CD4⁺ stanice prilikom ulaska u TME gube svoju prirodnu sposobnost proliferacije i multiplikacije u slučaju aktivacije prepoznatim antigenom te ubrzo nakon invazije tumorskog tkiva bivaju iscrpljene, ostaju bez mogućnosti proizvodnje obrambenih molekula te naposljetku umiru. Stanična smrt i anergija nastupaju poprilično brzo za razliku od ne-tumorskih patoloških stanja gdje je za takav ishod njihovog odgovora potrebno puno veći i dugotrajniji podražaj poput, naprimjer, onaj izazvan kroničnom upalom⁴². Za takvo neobično ponašanje u tumorskom mikrookolišu CD4⁺ i CD8⁺ stanica postoji mnogo različitih uzroka. Glavni razlog takvog neobičnog ponašanja limfocita je prisutnost citokina poput IL-10 i TGF-β, poznatih protuupalnih citokina proizvedenih od strane tumoru-pridruženih makrofaga (TAM). Skupina TAM čini veliki ukupni udio svih leukocita u mikrookolišu tumora te je dodatno povezana s nekoliko za tumor bitnih procesa: angiogeneza u tumorskom tkivu, otpuštajući TME-e angiogene čimbenike poput VEGF, MMP-9, bFGF-a i

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

adrenomedulina⁴³; daljnim novačenjem imunosupresivnih stanica putem citokina poput CCR4, CCR5, CCR6, CCL10⁴⁴; direktnim citotoksičnim djelovanjem na T limfocite putem PD-1/PD1-L sustava⁴⁵ te invazivnošću i metastatskim potencijalom tumorskih stanica⁴⁶. Uz tumoru pridružene makrofage u mikrookolišu se još nalaze:

- TID stanice (engl. *tumor induced dendritic cells*; TIDC) aktivnost kojih je povezana s povećanom koncentracijom IDO molekula, kao i L-arginaze, također sama povećana ekspresija PD-L1 proteina uzrokuje propadanje populacija T limfocita⁴⁷
- MDS stanice (engl. *myeloid derived supresor cells*; MDSC.) za koje je pokazano da posjeduju širok spektar mehanizama supresije protutumorskih aktivnosti u TME-u⁴⁸
- regulatorne stanice T

Kombinirano djelovanje svih tih triju staničnih tipova u mikrookolišu tumora uzrokuje veoma jaki tumorski odgovor na napade domaćina, a veoma bitnu ulogu u kontroli i koordinaciji tumorske obrane imaju regulatorne stanice T čija uloga u cijeloj toj priči će biti pomno proučena.

Uspostava populacija regulatornih T stanica u tumorskom mikrookolišu

Pitanje uspostavljanja populacija Treg stanica u mikrookolišu tumora je tipično „kokoš ili jaje“ pitanje u okviru proučavanja populacija regulatornih stanica i njihovog učinka na pojavu, razvoj i metastaziranje tumora. Odgovor na pitanje dolazi li prvo do nastanka populacije tumorskih stanica koja onda svojim daljnim proliferiranjem i preuzimanjem poznatih puteva utjecaja na limfocite T uzrokuje privlačenje populacija Treg stanica i preobrazbu postojećih naivnih populacija CD4⁺ limfocita ili je pak suprotan slučaj, da postojeća populacija Treg stanica u blizini budućeg mjesta nastanka tumora već i prije samog nastanka tumora vrši imunosupresijsko djelovanje i samim time olakšava tumorigenezu. Jednoznačni odgovori kao takvi ne postoje već je kao i u svemu što se tiče nastanka tumora i komunikacije stanica priča puno zamršenija.

Istraživanja tako u velikoj mjeri potvrđuju da je upravo kasnije spomenuti slučaj sigurniji, da na mjestu previđene tumorigeneze postoji prirodna povećana akumulacija Treg stanica koja omogućava tumorigenezu u slučaju pogodnog scenarija. Tako je utvrđeno da u slučaju raka pluća u mišjim modelima SCLC-a (engl. *small cell lung cancer*) Treg stanice u blizini

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

tumorskih stanica visoko koreliraju s koncentracijom COX-2 molekula, inače povezanih s pro-tumorskim djelovanjem. Koncentracija tih molekula je povezana s koncentracijom nikotin-deriviranih molekula, inače najčešćih ostataka duhanskog dima i produktima metabolizma nikotina u organizmu, tj. povećana količina nikotin-deriviranih molekula povećava koncentraciju COX-2 molekula u plućima djelujući na populaciju Treg stanica, što potencijalno rezultira izrazitim protumorskim djelovanjem.⁴⁹ Nadalje, s obzirom da je već godinama poznata veza mjesta kroničnih upala u raznim organskim sustavima s povećanom pojavnošću tumora putem brojnih mehanizama koji uključuju makrofage i T limfocite⁵⁰, te kao što je već spomenuto, regulatorne stanice T igraju jednu od ključnih uloga u regulaciji upale i protuupalnog odgovora, te je tako njihov povećan broj povezan s kroničnim upalnim modelima^{51,52}, moguće je zaključiti da upravo rezultat preintenzivne imunosupresije u okolini brzodjeljećih stanica, poznatih „hot-spot“ nastanka tumora, koji nastaju kao posljedica kroničnih upala, dovodi do tumorigeneze⁵¹. Iako razumno objašnjenje, potrebno je još istraživanja o samoj vezi Treg stanica u kroničnoj upali i tumorigenezi. Istraživanja su također pokazala da je u slučaju KRAS mutanata, poznatog proto-onkogenog povezanog s nekoliko vrsta različitih malignih oboljenja, za uspostavu početne populacije tumorskih stanica izrazito važna populacija Treg stanica i mogućnost preobrazbe naivnih CD4⁺ stanica u Treg stanice putem IL-10 i TGF- β ⁵³, te kao rezultat nedostatka te veze u KRAS- Fxp3-mišjim modelima broj tumora pluća je pao i do 75% u odnosu na same KRAS mutante. Također je pokazan i povećani broj Fxp3 stanica u plućima nakon izlaganja poznatim kancerogenima i to prije samog nastanka tumora što sve može dovesti od zaključka da je potrebna populacija Treg stanica kako bi se razvilo pogodno okruženje razvitku tumora⁵⁴.

Budući da je intrigantna stanična komunikacija prisutna u tumorigenezi veoma zamršena, neka istraživanja su nasuprot ovim gore navedenima pokazala da je zapravo količina Treg stanica prije tumorigeneze, iako važna, nije ključan čimbenik u tumorigenezi, već da tumorske stanice posjeduju način preuzimanja mehanizama stanične komunikacije koje inače pripadaju limfocitima te uz pomoć tih mehanizama privlače mnogobrojne Treg stanice u svoju okolinu. Tako je naprimjer pokazano da tumorske stanice mogu proizvesti CCL22 (engl. *chemokine ligand 22*) koji se veže na CCR4⁺ (engl. *chemokine receptor 4*) receptor Treg stanica, međureakcija za koju je pokazano da omogućava novačenje i zadržavanje Treg stanica u tumorskom mikrookolišu⁵⁵. Također je pokazano da u hipoksičnom stanju uzrokovanom nepovezanošću novonastale populacije tumorskih stanica u jajniku s krvotokom domaćina

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

dolazi do povećanog lučenja CCL28 (engl. *CC-chemokine ligand 28*) koji u međureakciji s CCR10 receptorom Treg stanica dovodi do akumulacije Treg stanica kako bi se iskoristila njihova uloga u angiogenezi⁵⁶. Još jedan važan način tumorskog privlačenja Treg stanica je sekrecija VEGF čimbenika u krvotok. VEGF se veže za receptor Neuropilin-1 izražen na Treg stanicama posljedično privlačeći populacije Nrp1+ Treg stanica u tumorski okoliš, te je dodatno pokazano da Treg stanice migriraju duž VEGF gradijenta, te nedostatak neuropilina-1 direktno utječe na sposobnost zadržavanja Treg stanica u TME-u⁵⁷. Uz direktno otpuštanje Treg privlačćih kemokina u okoliš, tumorske stanice posjeduju još nekoliko načina dodatnog novačenja i zadržavanja povećanog broja Treg stanica u svom okolišu poput: lučenja IL-10 i TGF- β kojima potiču perifernu diferencijaciju naivnih CD4⁺ Tlimfocita u Treg limfocite; korištenja IDO signalnog puta za preobrazbu CD4⁺ naivnih limfocita⁵⁸ (u nekim slučajevima uz pomoć MDSC-a koje se nalaze u neposrednoj blizini tumora)⁵⁹ te samih metaboličkih svojstava tumorskih stanica. Naime metabolička aktivnost karakteristična za tumorske stanice rezultira značajnim smanjivanjem koncentracije glukoze i povećavanjem količine mliječne kiseline u okolišu tumora. Temeljem navedenog, sami metabolizam tumorskih stanica stvarajući takav okoliš uzrokuje zadržavanje i proliferaciju Treg stanica kojima su ti uvjeti prihvatljivi dok ostale T stanice nisu sposobne normalno živjeti u tim uvjetima te umiru⁶⁰.

Uz sve navedene činjenice očito je da je završni univerzalni odgovor, na pitanje induciraju li Treg stanice nastanak tumora ili tumorske stanice iniciraju akumulaciju Treg stanica, teško dobiti već je posrijedi intrigantna igra mnogih staničnih mehanizama koji u različitim kontekstima mogu dati različite rezultate, ali na kraju završavaju sa istim rezultatom, da se Treg stanice nalaze unutar međustaničnih prostora tumorskih tkiva te svojim djelovanjem promoviraju tumorsku aktivnost. Unatoč svemu navedenome dosta toga je u cijeloj priči još nepoznato te su potrebna daljnja istraživanja da utvrde postoji li način prevencije posljedica ovih međureakcija.

Aktivnost regulatornih stanica T u razvoju tumora

Nakon uspješnog novačenja u područje tumorskog mikrookoliša Treg stanice imaju imunosupresivnu funkciju. Tumor infiltrirajuće (TI) stanice iskazuju širok spektar posebnih staničnih receptora i posebno pojačan izražaj biljega koji im daju imunosupresivnu moć čak i veću od konveknionalnih Treg stanica izoliranih iz periferne krvi. U TI Treg stanicama je tako prisutna iznadprosječna : količina PD-1 receptora, količina CTLA-4 receptora, ekspresija

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

LAG-3 gena, TIM-3 proteina (engl. *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 protein*), količina inducibilnog T staničnog kostimulatora (ICOS), ekspresija GITR gena i biljega aktivacije T stanica CD25 i CD69⁶¹.

Kombinacija pojačanog izražaja svih navedenih gena i pripadajućih respresornih molekula u tumorskom mikrooklišu dovodi do kumulativnog učinka na sve populacije stanica inače uključenih u obranu od tumora. TI Treg stanice tako svojim djelovanjem u tumorskom mikrookolišu pomoću ponajviše IL-10 i TGF- β čimbenika, kao i ostalih sustava imunosupresije, utišavaju aktivnost $\gamma\delta$ T stanica kao i pomagačkih CD4⁺ T stanica^{62,63}. U pacijenata s rakom probavnog sustava Treg stanice uspješno vrše svoju imunosupresivnu aktivnost pomoću ciklooksigenaze-2 (COX-2) i prostaglandina E-2. Isto tako brojna istraživanja su pokazala visokosuprimarajuću aktivnost TI Treg stanica izoliranih iz drugih vrsta karcinoma, baziranu na pojačanom izražaju receptora ibiljega GITR i CTLA4 s posebnim naglaskom na važnost TIM-3 proteina^{64,65,66}.

Koristeći nadprosječni izražaj pojedinih receptora kao i nadprosječno izlučivanje citokina Treg stanice imaju pojačanu supresivnu funkciju u odnosu na Treg stanice izolirane iz periferne krvi ili netumorskih tkiva⁶⁵, te, posljedično svojoj potenciji, mogu u tumorskim tkivima djelovati na CD4⁺ i CD8⁺ limfocite učinkovitije nego što to rade u zdravim tkivima, izazvati njihovu anergiju brže i potpunije, spriječiti njihovu proliferaciju i time onemogućiti njihov protutumorski učinak i pomoći razvoju tumora.

Usprkos u cjelini povećanoj imunosupresivnoj funkciji TI Treg populacija, važno je napomenuti da svi TI Treg limfociti nisu posve jednaki već da postoje određene razlike među skupinama što se tiče same aktivnosti u tumorskim tkivima. Miayara i sur.⁶⁷ su tako pokazali da postoji 3 različita tipa Treg stanica:

1. CD45-Foxp3^{hi} efektorske Treg stanice
2. CD45-Foxp3^{lo} Treg stanice mirujuće
3. CD45-Foxp3^{lo} ne-supresivne stanice

Skupina efektorskih Treg (eTreg) stanica predstavlja krajnje diferencirane Treg stanice s izrazito jakim supresivnim učinkom za koje je pokazano da su dominantni u TIL populaciji kolono-rektalnih karcinoma, kao i u melanoma i karcinoma pluća. Prisustvo eTreg stanica povezano je s lošijim prognozama pacijenata kod kolono-rektalnog karcinoma⁶⁸ te

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

poboljšano stanje pacijenata oboljelih od leukemije koji su sudjelovali u istraživanju gdje su korištena protu-CCR4 protutijela kako bi se reducirala populacija eTreg limfocita⁶⁹, ukazujući na to da eTreg stanice čine glavni podskupinu tumor-promovirajućih Treg limfocita. Važnost ovakvog razlučivanja različitih tipova Treg stanica pridruženih tumorskim tkivima leži u potencijalnom otkrivanju protutumorskih alata dizajniranih posebno za točno onu grupu Treg limfocita na koje želimo djelovati bilo u imunotereputske ili u biomarkerske svrhe.

Komunikacija regulatornih stanica T s ostalim stanicama u mikrokolištu tumora

Treg stanice imaju izražene imunosupresijske sposobnosti, sposobnosti koje koriste kako bi utišale jačinu imunosnog odgovora u netumorskim poremećajima zbog spriječavanje prejakog ili neadekvatnog odgovora. To ostvaraju putem međureakcije s ostalim tipovima T stanica, ali također komunikacijom s ostalim stanicama imunosnog sustava. Sposobnost komunikacije s ostalim stanicama imunosnog sustava je posebno važna u slučaju tumora, kada na izvršne T stanice ne djeluju samo Treg stanice već i ostali stanični tipovi koje se nalaze u blizini, te kada se imunosnom sustavu domaćina onemoguće i drugi načini nošenja s poremećajem. Treg stanice tako komuniciraju sa i/ili utišavaju s mnogobrojnim stanicama prisutnim u TME.

Komunikacija s NK(engl. *natural killer*) stanicama

Broj istraživanja koja proučavaju međureakciju NK stanica, inače važnim igračima u protutumorskom odgovoru, s Treg stanicama je poprilično ograničen, no ipak je dokazano da komunikacija između NK stanica i Treg stanica postoji, te da TIL Treg stanice imaju velik utjecaj na NK stanične populacije u tumorima. Pronađeno je da Treg stanice imaju mogućnost utišavanja odgovora NK stanica u tumorskim tkivima putem TGF- β koji smanjuje ekspresiju NKG2D receptora na NK stanicama, receptora koje te stanice koriste za svoju pravilnu aktivaciju. Također, isto je istraživanje dokazalo da se prilikom osiromašenja tumora od Treg stanica broj pravilno aktiviranih NK stanica vraća u normalu⁷⁰. *In vitro* stanična manipulacija s Treg stanicama izoliranih iz periferne krvi i raka grlića maternice i proučavanje njihovog utjecaja na NK stanice pokazuje da TIL Treg stanice puno intenzivnije suprimiraju NK stanice od istih staničnih tipova izoliranih iz periferne krvi. Sukladno tome pokazalo se da je količina inhibicijskih receptora(CD158a, CD158b i NKG2A) na NK

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

stanicama povezanih s TIL Treg stanicama značajno veća, a količina stimulatornih NK receptora (NKG2D, NKp46 i NKp30) značajno manja⁷¹.

Komunikacija s MDS stanicama

MDS stanice su uz Treg stanice u tumorskim tkivima jedne od glavnih igrača i supresiji domaćinovog imunskog sustava. Istraživanja su tako pokazala da je komunikacija između Treg stanica i MDSC stanica izrazito važna u uspostavljanju TME imunosupresivnog okoliša, te da te dvije vrste stanice surađuju kako bi prigušile odgovor te unovačile dodatne imunosupresivne stanice. Pokazano je da je MDS stanice ccRCC (engl. *clear cell renal cell carcinoma*) mogu privući naivne CD4⁺ stanice u tumorski mikrookoliš pritom mijenjajući njihov nativni fenotip u onaj imunosupresijski Foxp3⁺ Treg stanica putem IL-10, TIM-3 i PD-1L posredovane stanične komunikacije pritom smanjujući proizvodnju efektornih citokina⁷². Naravno postoje i primjeri suprotnog učinka, da Treg stanice utječu na neaktivirane makrofage putem IL-10, IL-4 i IL-13 uzrokujući njihovu alternativnu aktivaciju i diferencijaciju u MDS stanice, te njihovo novačenje u tumorski okoliš gdje oni više ne mogu lučiti proupalne citokine⁷³ te onda putem B7-H1 signalnog puta Treg stanice direktno utječu na funkciju MDS stanica, potičući ih na lučenje protuupalnih citokina koji onda djeluju na efektorne limfocite T u tumorskom okolišu.

Komunikacija s antigen predočnim stanicama

Poput ostalih limfocita, Treg limfociti se također oslanjaju na ulogu APS-a u predočavanju antigena i aktivaciji. Dendritičke stanice i Treg stanice u tumorskom okolišu pokazuju veliku razinu međusobne komunikacije i kao rezultat te komunikacije naivne dendritičke stanice skupa s plazmacitoidnim dendritičkim stanicama također induciraju imunosnu toleranciju i potpomažu stvaranje Treg stanica putem ICOS/ICOS-L sustava⁷⁴. Treg stanice za uzvrat utječu na dendritičke stanice u tumorskom okolišu stimulirajući ih na izražaj imunosupresivnih B7-H4 i B7-H3 molekula koje inhibiraju aktivnost efektornih T stanica, te dodatno, B7 molekule mogu aktivirati put CTLA-4 molekula na Treg stanicama, uzrokujući proizvodnju IDO molekula u dendritičkim stanicama čija povećana količina potiče aktivaciju Treg stanica te tako nastaje jako učinkovita pozitivna povratna petlja⁷⁵ imunosupresivnog karaktera što, naravno, utječe na rast tumora.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

Komunikacija s endotelnim stanicama

Međureakcija endotelnih stanica s Treg stanicama je izrazito bitna u začetku razvoja tumora, kada je bitna početna uspostava određene količine Treg stanica. Endotelne stanice mogu u uvjetima upale privući slobodno cirkulirajuće Treg stanice te inducirati razvoj iTreg stanica⁷⁶. Također Treg stanice mogu u tumorskom kontekstu utjecati na ekspresiju selektina u endotelnim stanicama te tako ograničiti promet efektornih T stanica na ciljno mjesto⁷⁷.

Komunikacija s tumorskim stanicama putem eksosoma

Egosome tumora (engl. *tumor derived exosomes*; TEX) su nedavno otkrivene male (veličine virusa) membranom okružene vezikule ispuštane u mikrookoliš tumora od strane samih tumorskih stanica, te je za njih pokazano da prenose u sebi velik broj molekula i čimbenika koji uzrokuju supresiju imunskog sustava direktno utišavajući T limfocite i NK stanice⁷⁸. Te membranske vezikule također sudjeluju u aktivaciji i proliferaciji Treg stanica, te su tako pronađene vezikule koje sadržavaju ICOSL koji je sposoban inducirati prijelaz ICOS⁺CD4⁺ T limfocita u Treg limfocite. Slični je učinak tumorskih vezikula pronađen i na prekursore staničnih linija u koštanoj srži, potičućina diferencijaciju i akumulaciju Gr-1⁺ CD11b⁺ populacija MDSC-a⁷⁹ te izgleda da imaju važnu ulogu u utemeljenju tumorima pogodnog okoliša. Sudeći po njihovim do sada otkrivenim podacima moguće je da se iza tih vezikula krije još mnogo uloga kao i potencijalnih obrada, ali je to potrebno podrobnije istražiti.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

ULOGA REGULATORNIH STANICA T U NASTANKU METASTAZA

Sudeći po važnosti uloge Treg stanica u uspostavljanju primarnih tumora moguće je predvidjeti da će Treg stanice imati važnu ulogu i u uspostavljanju tumorskih metastaza te su istraživanja pokazala da različiti subtipovi Treg stanica pokazuju loše prognoze pacijenata oboljelih od karcinoma, te da su povezani s pojavom metastaza kod različitih vrsta humanih karcinoma:

- CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺RANKL⁺ dokazano stimuliraju metastaze HER2⁺ raka dojke⁸⁰
- CD4⁺Foxp3⁺ dokazano stimuliraju metastaze Muc1⁺ modela raka jajnika⁸¹
- CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}Treg stanice igraju važnu ulogu u metastazama humanog raka skvamoznih stanica vrata i glave⁸²
- CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg stanice sudjeluju u stvaranju metastatičnih limfnih čvorova u pacijenata oboljelih od papilarnog raka štitnjače⁸³

Prisustvo Treg stanica u tumorskim tkivima te njihova prisutnost i uloga u tkivu s metastazama pokazuje da se Treg stanice i u metastatičnim tkivima koriste istim mehanizmima kako bi olakšale razvoj tumora. Unatoč poznavanju mehanizama imunosupresije istraživanja koja pokušavaju utvrditi na koji se način Treg stanice novače na mjesta budućih metastaza su malobrojna te su točni mehanizmi lokalizacije za sada nepoznati. Tako su naprimjer Treg stanice, točnije njihova akumulacija, bile povezane s razvojem metastaza u mišjem modelu (B16F10) karcinoma pluća. U ovom istraživanju je obrada humanim rekombinantnim TNF-om životinja oboljelih od karcinoma pluća dovela do povećane akumulacije Treg stanica u plućima kao i povećane ekspresije TNF2 receptora, povećanog broja metastaza na samim plućima uzrokovano Treg djelovanjem na CD8⁺ limfocite, čiji se broj u plućima drastično smanjio nakon obrade. Nakon uklanjanja Treg staničnih populacija pomoću toksina bakterije *Corynebacterium diphtheriae*, broj metastaza u istom modelu drastično pada⁸⁴. Uz važnost direktne supresije imunskog sustava u budućim mjestima metastaza, zanimljiv je i utjecaj Treg stanica na RANK/RANKL sustav u stanicama karcinoma. RANK (engl. *receptor activator nuclear factor-κB*) je stanični receptor iz TNF-receptor obitelji, uključen u normalne metaboličke puteve osteogeneze, ali i u sazrijevanju limfnih čvorova⁸⁵. U slučaju tumora njegov izražaj je dosta čest te čak 89% tumora daje pozitivne rezultate na testove prisutnosti RANK receptora na membranama⁸⁶. Razlog zašto je taj receptor visoko izražen u tumorskim stanicama nije potpuno poznat, no smatra se da leži u

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

moćnosti RANK receptorske aktivacije antiapoptotičke kinaze APK/PKB koristeći signalni put SRC kompleksa/TRAF6⁸⁷ i u kočenju izražaja metastaznog inhibitora serpina 5 (maspin). Treg limfociti tu dolaze u igru, te se upravo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ stanice pokazuju kao glavni proizvođači RANK liganda u tumorskim tkivima te spriječavanje međureakcije RANK/RANKL ili uklanjanje Treg limfocita značajno utječe na sposobnost metastaza u promatranim tumorima⁷⁹. Rezultat aktivacije RANK/RANKL sustava omogućava određenim vrstama tumora bržu proliferaciju, pa time posljedično veću sposobnost metastaziranja.

Dodatni način na koji tumorska tkiva uz pomoć komunikacije s Treg stanicama olakšavaju nastajanje metastaza je već prije spomenuti VEGF-A/Nrp-1 signalni put. Istraživanja na CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg stanicama izoliranih iz mišje slezene, kao i CD4⁺CD25⁺ Treg stanicama izoliranih iz ljudskih pacijenata kasnih stadija raka epitela jajnika pokazala su da nakon što su Treg stanice uvedene u tumorski okoliš putem VEGF čimbenika, one same počinju lučiti VEGF-A dodatno ubrzavajući proces angiogeneze u tumorskom tkivu. Rezultat angiogeneze u tumorskom tkivu je njegova uspješna povezanost s krvnim i limfnim sustavom domaćina te uz sve potrebne uvjete znatno olakšava metastaziranje tumora.

Ovi svi navedeni mehanizmi koje koriste razni tipovi Treg stanica prisutni u tumorskom okolišu u kombinaciji s ostalim načinima supresije već navedenim u ovome radu daju Treg stanicama važnu ulogu u svim etapama razvoja tumora u domaćinu, od omogućavanja nastanka, pomoći u proliferaciji i održavanju te metastaziranju. Ta ključna uloga u tumorskim međureakcijama daje mogućnost ciljanja Treg stanica kao mogućih meta određenih protutumorskih lijekova koje bi trebalo podrobnije istražiti.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

ULOGA REGULATORNIH STANICA T U IMUNOTERAPIJI

Imunoterapija je po definiciji način liječenja pacijenta s ciljem obnove ili pojačavanja imunskog odgovora pacijenta tako da se imunski sustav potpomognut vanjskom intervencijom nosi s bolešću. U slučaju liječenja karcinoma razlikujemo dvije različite vrste imunoterapije: aktivna i pasivna. Pasivna imunoterapija se služi citokinima poput IL-12, unaprijed pripremljenim protutijelima na tumor-specifične antigene tako obilježavajući tumorske stanice domaćinom imunskom sustavu koji ih onda uništava ADCC (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ili ADPC (engl. *Antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte-mediated cytolysis*) putem, ili putem izolacije domaćinovitih T limfocita, uzgoja i pripreme za prepoznavanje tumor-specifičnih antigena putem genetičke rekombinacije *in vitro* te vraćanja tih limfocita u tijelo pacijenata kako bi nastavili borbu s tumorom. Aktivna imunoterapija je u zaćecima koristila svojevrsna cjeviva protiv tumora, ubrizgavanjem lizata tumorskih stanica ili izoliranih peptida u krvotok pacijenta kako bi se imunski sustav senzibilizirao na antigen te ga uspješno prepoznao u kontekstu bolesti no taj način terapije nije se pokazao učinkovit zbog slabe imunogeničnosti određenih peptida kao i raznovrsnosti tumorskih stanica. Novi, alternativni pristup aktivnoj imunoterapiji koristi princip „check-point blocker“ (engl. *immune checkpoint inhibitor*; ICI) koji se umjesto liganda vežu na važne regulatorne receptore. Takav način imunoterapije cilja izravno Treg receptore ili one receptore koje Treg stanice mogu koristiti u komunikaciji s Teff stanicama poput CD25, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3 ili TGIT receptora tako onemogućavajući njihovu aktivaciju putem drugih molekula te smanjenjem inhibitorskog učinka tumorskog okoliša na efektorne T limfocite⁸⁸. Korištenje ICI molekula se pokazuje kao glavni put prema naprijed u protutumorskim imunoterapijama i štoviše većina ICI molekula na ovaj ili onaj način djeluje na Treg molekule zbog njihovog centralnog mjesta u uspostavljanju i održavanju tumorskog mikrookoliša. Zbog činjenice da su upravo Treg stanice u centru mnogih imunoterapija važno je proučavati i razumijeti mehanizam djelovanja tih lijekova na Treg stanice te na ostale stanice uključene u tu cijelu priču.

Glavni načini imunoterapije koristeći „immune check point inhibitor“ molekule

Korištenje ligand usmjerenih toksina te monoklonalnih protutijela se pokazalo kao najvjabilnija metoda direktnog smanjivanja broja Treg stanica u tumorskim tkivima. Neki od načina terapije umanjivanja broja Treg stanica su lijekovi poput daclizumaba i basiliximaba

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

koji su CD25 specifična protutijela te posljedično uzrokuju osiromašenje citokina važnih za funkciju poput IL-2 u ciljnim stanicama te usmjeravaju ADCC sustav domaćina na ciljne stanice uzrokujući njihovu smrt. Stanice na koje se ta protutijela vežu su uglavnom Treg stanice u tumorskom okolišu te je korištenje ovog načina terapije pokazalo djelomičnu uspješnost u regeneraciji funkcije Teff stanica u TME-u,⁸⁹ no budući da i Teff stanice također mogu biti CD25⁺ fenotipa može doći do suprotnog učinka, kada se protutijela ciljano vežu na Teff stanice imajući isti učinak na njih kao i na Treg stanice. Postoji također vrsta terapije sličnog principa, koje protutijelima ciljaju CTLA-4 receptor Teff i Treg stanica i tako uzrokuju blokiranje CTLA-4/B7 međureakcija koje utječu na broj Teff stanica. Mehanizmi kojima lijekovi poput ipilimumaba djeluju na Teff stanice su pomno istraženi te se lijek pokazao kao djelotvoran u nekoliko tipova karcinoma, no točni mehanizmi kako ti lijekovi djeluju na Treg stanice nisu toliko istraženi. Smatra se da je upravo utjecaj anti CTLA-4 protutijela na Treg stanice presudan za uspješnost terapije. Nedavna istraživanja pokazuju upravo na važnost međureakcije anti CTLA-4 protutijela s Treg stanicama uz priutnost FcγR (Fcγ receptor eksprimirajućih) makrofaga. Naime slično kao u prijašnjem slučaju, protutijela se vežu na CTLA-4 receptor Treg stanica te dolazi do propadanja vezanih stanica putem ADCC sustava uz prisutnost makrofaga⁹⁰. Dodatna *ex vivo* istraživanja istoga lijeka pokazala su da specifično vezanje može potaknuti i ADCC posredovanu NK stanicama.⁹¹ Ciklofosfoamid je još jedan novootkriveni lijek koji pokazano ima mogućnost smanjivanja broja Treg stanica u pacijenata oboljelih od terminalnog stadija karcinoma, uzrokujući promjenu omjera Teff:Treg stanica tako stabilizirajući stanje pacijenta. Mehanizam kojim ciklofosfoamid djeluje nije točno poznat, no zabilježeno je da u početku terapije opada ukupni broj svih T limfocita u tumorskim tkivima, da bi brza proliferacija Teff stanica i njihova migracija u tumor brzo nadomjestila ukupan broj T limfocita i pojačala protumorski odgovor.⁹² Ove sve navedene terapije ciljaju sve stanice koje izražavaju pojedini receptor, ili sve T limfocite te uzrokuju njihovu smrt. Takvo citotoksično djelovanje svih stanica na koje se mogu vezati nije uvijek optimalno te se razvijaju druge metode koje će direktnije djelovati samo na supresivnu funkciju Treg stanica.

Način na koji drugi tipovi lijekova poput Keytruda djeluju na Treg stanice je sličan gore već spomenutim. Opet se radi o specifičnim protutijelima za još jedan ključni receptori Treg stanica: PD-1. Protutijela specifično dizajnirana da onemogućuju međureakciju PD-1/PD-1L su pokazala značajan napredak u regulaciji supresivne moći Treg stanica, pa tako usred blokade PD-1 puta dolazi do smanjenja ekspresije Foxp3 gena u Treg stanicama,

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

nTreg stanice gube dio prirodne funkcije, a naivne CD4⁺ stanice se puno teže diferenciraju u iTreg stanice. Također takve stanice pokazuju povećanu ekspresiju PD-1 i iscrpljen fenotip koji im onemogućava pravilnu supresiju proliferacije Teff stanica rezultirajući, opet, promjenom broja Teff stanica te protutumorskom djelovanju za sada dokazanom na melanomima i karcinomima.^{93,94} Naravno nije PD-1/PD-1L sustav jedini način supresije koji se može iskoristiti u svrhu imunoterapije posredovane Treg stanicama, te je u zadnje vrijeme puno istraživanja posvećeno drugim načina međureakcije lijekova i Treg stanica s ciljem njihove supresije. Tako se na meti istraživanja utjecaja specifičnih protutijela našao i LAG-3 receptor. Ustanovljeno je da vezanje LAG-3 receptora na površini Treg stanica putem specifičnih protutijela uzrokuje značajno slabije otpušanje supresivnih citokina IL-10 i TGF- β u TME-u te su klinička ispitivanja lijeka na toj bazi već počela kod neobrađenih pacijenata nekoliko tumora⁹⁵. Uz ove navedene terapije, postoje brojne i potencijalno bolje mogućnosti, pa su tako klinička istraživanja korištenja novih lijekova na bazi protutijela za vezanje TIM-3 receptora i TIGIT receptora već započela. Iako su još u početnim stadijima istraživanja pokazuju velik potencijal zbog specifičnosti receptora za Treg limfocite u svrhu smanjivanja nespecifičnog vezanja na druge limfocite te izraženog djelovanja blokiranog receptorskog puta na fenotip upravo Treg stanica i samim time blokiranje Treg stanične funkcije^{96,97,98}.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

ZAKLJUČAK

Iako dugo marginizirana skupina T limfocita, Treg limfociti su se pokazali kao uistinu važni igrači u imunosnom sustavu zbog sposobnosti ciljane supresije točno određenih dijelova imunosnog odgovora. Složenog načina diferencijacije za kojeg je ključna kompleksna međureakcija mnogih sustava. Treg stanice u organizmu igraju jako važnu funkciju, posredovanu cijelim setom molekularnih alata. Njihovu specifičnu sposobnost utišavanja i reguliranja imunosnog odgovora, inače za organizam nezamjenjivu, tumorska tkiva koristeći brojne mehanizme mogu iskoristiti u svoju korist, tako preuzimajući kontrolu nad određenim dijelom Treg stanične populacije i iskorištavajući pritom njihove regulatorne sposobnosti. Tumorska tkiva se tako pomoću Treg stanica mogu uspješno obraniti od domaćinovog imunosnog sustava, te Treg stanice koje je tumor privukao u svoju blizinu omogućuju olakšano uspostavljanje pogodnog okoliša, olakšanu proliferaciju i tvorenje metastaza. Ipak tako važna uloga Treg stanica u životu tumora pokazala se ujedno kao i potencijalna meta protutumorskih terapija, te se upravo načini regulacije populacija Treg stanica u tumorima pokazuju kao važni alati u samoj borbi protiv te bolesti i to s razvojem tehnologija rekombinante DNA i znanja o imunosnom sustavu sa sve većim postotkom uspjeha, potencijalno pružajući univerzalno najmanje invazivno rješenje.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

Literatura

1. Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. Wiley 18(5):723-37.
2. Walker LSK (2004) CD4+ CD25+ Treg: divide and rule? *Immunology*. Wiley 111(2): 129–137.
3. Bloom BR, Salgame P and Diamond B (1992) Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunology Today*. Elsevier BV 13(4): 131–136.
4. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*. Springer Nature 27(1): 20–21.
5. Kim JM, Rasmussen JP and Rudensky AY (2006) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature Immunology*. Springer Nature 8(2): 191–197.
6. Khaja ASS, Toor SM, Salhat HE et al. (2017) Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC 8(20).
7. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M and Takabayashi A (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*. Wiley 98(5): 1089–1099.
8. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H et al. (2005) Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*. American Association for Cancer Research (AACR) 65(6): 2457–2464.
9. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*. Springer Nature 10(9): 942–949.
10. Chen W, Jin W, Hardegen N et al. (2003) Conversion of Peripheral CD4+CD25–Naive T Cells to CD4+CD25+Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 198(12): 1875–1886.
11. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD and Xia B (2012) CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. Hindawi Limited 2012: 1–12.

Commented [N01]: Ujednači način pisanja literature! Puni časopis ili skraćena, god, volumen, stranice!!!

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

12. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD et al. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. Springer Nature 445(7129): 771–775.
13. Hsieh C-S, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD and Rudensky AY (2006) An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature Immunology*. Springer Nature 7(4): 401–410.
14. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA and Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*. Springer Nature 6(11): 1142–1151.
15. Burchill MA, Yang J, Vang KB and Farrar MA (2007) Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology Letters*. Elsevier BV 114(1): 1–8.
16. Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA et al. (2008) IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 181(5):3285-90.
17. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C et al. (2007) IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 178(1):280-90.
18. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D et al. (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology*. Springer Nature 6(12): 1219–1227.
19. Huang H, Ma Y, Dawicki W, Zhang X and Gordon JR (2013) Comparison of Induced versus Natural Regulatory T Cells of the Same TCR Specificity for Induction of Tolerance to an Environmental Antigen. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 191(3): 1136–1143.
20. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 155(3):1151-64.
21. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield et al. (2002) Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature Medicine*. Springer Nature 8(9): 1024–1032.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

22. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C et al. (2002) Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nature Medicine*. Springer Nature 8(6): 625–629.
23. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA and Weiner HL (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. American Association for the Advancement of Science: 265(5176):1237-40.
24. Aluvihare VR, Kallikourdis M and Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*. Springer Nature 5(3): 266–271.
25. Hori S, Carvalho TL and Demengeot J (2002) CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *European Journal of Immunology*. Wiley 32(5):1282-91.
26. Baecher-allan C, Viglietta V and Hafler DA (2002) Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 169(11):6210-7.
27. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H and Matzinger P (2002) 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nature Immunology*. Springer Nature 5(6):615-22.
28. Chai JN, Zhou YW and Hsieh C-S (2014) T cells and intestinal commensal bacteria-ignorance, rejection, and acceptance. *FEBS Letters*. Wiley 588(22): 4167–4175.
29. Anderson CC (2009) Placing regulatory T cells into global theories of immunity: an analysis of Cohn's challenge to integrity (Dembic). *Scandinavian Journal of Immunology*. Wiley 69(4):306-9.
30. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. Springer Nature 450(7169):566-9.
31. Hawrylowicz CM and O'garra A (2005) Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology*. Springer Nature 205(4):271-83.
32. Kearley J, Barker JE, Robinson DS and Lloyd CM (2005) Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 202(11):1539-47.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

33. Kursar M, Koch M, Mittrücker HW, et al. (2007) Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 178(5):2661-5.
34. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, et al. (2007) Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 204(2):273-83.
35. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ and Sacks D (2007) CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 204(2):285-97.
36. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL and Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 190(7):995-1004.
37. Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, et al. (2007) Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. American College of Obstetricians and Gynecologists 110(5):1137-45.
38. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP and Ley TJ (2004) Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. American Society of Hematology 104(9):2840-8.
39. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S and Noelle RJ (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 174(4):1783-6.
40. Cederbom L, Hall H and Ivars F (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology*. Wiley 30(6):1538-43.
41. Read S, Malmström V and Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 192(2):295-302.
42. Jiang Y, Li Y and Zhu B (2015) T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death and Disease*. Springer Nature 6:e1792.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

43. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A and Kzhyshkowska J (2014) Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. 5:75.
44. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*. Springer Nature 10(9):942-9.
45. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. (2017) PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. Springer Nature 545(1):495–9
46. Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. Cell Press 124(2):263-6.
47. Petty AJ and Yang Y (2017) Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. Future Medicine 9(3):289-302.
48. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C and Utikal J (2016) The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines* (Basel). MDPI 4(4)
49. Razani-boroujerdi S and Sopori ML (2007) Early manifestations of NNK-induced lung cancer: role of lung immunity in tumor susceptibility. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Thoracic Society 36(1):13-9.
50. Cordon-cardo C and Prives C (1999) At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 190(10):1367-70.
51. Hirano T, Kodama S, Kawano T and Suzuki M (2016) Accumulation of Regulatory T Cells and Chronic Inflammation in the Middle Ear in a Mouse Model of Chronic Otitis Media with Effusion Induced by Combined Eustachian Tube Blockage and Nontypeable *Haemophilus influenzae* Infection. *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology 84(1):356-64.
52. Kryczek I, Wu K, Zhao E, et al. (2011) IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 186(7):4388-95.
53. Zdanov S, Mandapathil M, Abu eid R, et al. (2016) Mutant KRAS Conversion of Conventional T Cells into Regulatory T Cells. *Cancer Immunology Research*. American Association for Cancer Research 4(4):354-65.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

54. Granville CA, Memmott RM, Balogh A, et al. (2009) A central role for Foxp3+ regulatory T cells in K-Ras-driven lung tumorigenesis. *PLoS ONE. Public Library of Science* 4(3):e5061.
55. Faget J, Biota C, Bachelot T, et al. (2011) Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Research. American Association for Cancer Research* 71(19):6143-52.
56. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, et al. (2011) Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature. Springer Nature* 475(7355):226-30.
57. Hansen W, Hutzler M, Abel S, et al. (2012) Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *Journal of Experimental Medicine. Rockefeller University Press* 209(11):2001-16.
58. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, et al. (2007) Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood. American Society of Hematology* 109(7):2871-7.
59. Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology. Springer Nature* 4(12):941-52.
60. Angelin A, Gil-de-gómez L, Dahiya S, et al. (2017) Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metabolism. Cell Press* 25(6):1282-1293.e7.
61. Chaudhary B and Elkord E (2016) Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel). MDPI* 4(3)
62. Amedei A, Niccolai E, Benagiano M, et al. (2013) Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that ENO-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/Th17 effector cell functions. *Cancer Immunology, Immunotherapy. Springer Nature* 62(7):1249-60.
63. Yi Y, He HW, Wang JX, et al. (2013) The functional impairment of HCC-infiltrating $\gamma\delta$ T cells, partially mediated by regulatory T cells in a TGF β - and IL-10-dependent manner. *Journal of Hepatology. Elsevier* 58(5):977-83.
64. Yuan XL, Chen L, Li MX, et al. (2010) Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clinical Immunology. Elsevier* 134(3):277-88.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

65. Yan J, Zhang Y, Zhang JP, Liang J, Li L, Zheng L. (2013) Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. *PLoS ONE. Public Library of Science* 8(3):e58006.
66. Bu M, Shen Y, Seeger WL, et al. (2016) Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8(+) T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression. *Tumour Biology. Springer* 37(3):3949-56.
67. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al. (2009) Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity. Elsevier BV* 30(6): 899–911.
68. Saito T, Nishikawa H, Wada H et al. (2016) Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine. Springer Nature* 22(6): 679–684.
69. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, et al. (2013) Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. United States National Academy of Sciences* 110(44):17945-50.
70. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M et al. (2005) CD4+CD25+regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine. Rockefeller University Press* 202(8): 1075–1085.
71. Chang WC, Li CH, Chu LH et al. (2016) Regulatory T Cells Suppress Natural Killer Cell Immunity in Patients With Human Cervical Carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer. International Gynecologic Cancer Society and the European Society of Gynaecological Oncology* 26(1):156-62.
72. Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, et al. (2013) Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology. Taylor & Francis Inc.* 2(3):e23562.
73. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG et al. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. United States National Academy of Sciences.* 104(49):19446-51.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

74. Pedroza-gonzalez A, Zhou G, Vargas-mendez E, et al. (2015) Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology*. Taylor & Francis Inc. 4(6):e1008355.
75. Sharma MD, Baban B, Chandler P, et al. (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation 117(9):2570-82.
76. Taflin C, Favier B, Baudhuin J et al. (2011) Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7): 2891–2896.
77. Maganto-Garcia E, Bu D -x., Tarrio ML et al. (2011) Foxp3+-Inducible Regulatory T Cells Suppress Endothelial Activation and Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists 187(7): 3521–3529.
78. Whiteside TL (2013) Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochemical Society Transactions*. Portland Press 41(1):245-51.
79. Xiang X, Poliakov A, Liu C, et al. (2009) Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International Journal of Cancer*. Wiley 124(11):2621-33.
80. Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. (2011) Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. Springer Nature 470(7335):548-53.
81. Budiu RA, Elishaev E, Brozick J, et al. (2013) Immunobiology of human mucin 1 in a preclinical ovarian tumor model. *Oncogene*. Springer Nature 32(32):3664-75.
82. Drennan S, Stafford ND, Greenman J, Green VL (2013) Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/-) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement. *Immunology*. Wiley 140(3):335-43.
83. French JD, Kotnis GR, Said S, et al. (2012) Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Oxford University Press 97(6):E934-43.

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

84. Chopra M, Riedel SS, Biehl M, et al. (2013) Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis*. Oxford University Press 34(6):1296-303.
85. Boyce BF, Xing L (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*. Springer Nature 9 Suppl 1:S1.
86. Santini D, Perrone G, Roato I, et al. (2011) Expression pattern of receptor activator of NF κ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *Journal of Cellular Physiology*. Wiley 226(3):780-4.
87. Bharti AC, Takada Y, Shishodia S, Aggarwal BB. (2004) Evidence that receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand can suppress cell proliferation and induce apoptosis through activation of a NF- κ B-independent and TRAF6-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology 279(7):6065-76.
88. Escribese MM, Barber D. (2017) New insight into cancer immunotherapy. *Allergologia et Immunopathologia (Madrid)*. Elsevier 45 Suppl 1:50-55.
89. Rech AJ, Vonderheide RH (2009) Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Wiley 1174:99-106.
90. Simpson TR, Li F, Montalvo-ortiz W, et al. (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press 210(9):1695-710.
91. Jie HB, Schuler PJ, Lee SC, et al. (2015) CTLA-4⁺ Regulatory T Cells Increased in Cetuximab-Treated Head and Neck Cancer Patients Suppress NK Cell Cytotoxicity and Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Research*. American Association for Cancer Research. 75(11):2200-10.
92. Scurr M, Pembroke T, Bloom A, et al. (2017) Low-Dose Cyclophosphamide Induces Antitumor T-Cell Responses, which Associate with Survival in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research 23(22):6771-6780.
93. Lowther DE, Goods BA, Lucca LE, et al. (2016) PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation 1(5)

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

94. Chen X, Fosco D, Kline DE, et al. (2014) PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation. *European Journal of Immunology*. Wiley 2014;44(9):2603-16.
 95. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/anti-lag-3-monoclonal-antibody-bms-986016>
 96. Yan J, Zhang Y, Zhang JP, Liang J, Li L, Zheng L. (2013) Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. *PLoS ONE*. Public Library of Science 28(3):e58006.
 97. Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow SF, et al. (2015) TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation 125(11):4053-62.
 98. Sasidharan nair V, Elkord E. (2018) Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunology and Cell Biology*. Springer Nature 96(1):21-33.
-

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima

Regulatorne stanice T i njihova veza s tumorima
